

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年7月28日(28.07.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/067920 A1

(51) 国际分类号⁷: A61K 31/366, 35/78, A61P 19/02, 29/00

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/001523

(22) 国际申请日: 2004年12月27日(27.12.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200310124512.0 2003年12月30日(30.12.2003) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海安普生物科技有限公司(SHANGHAI AMBROSIA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市春晓路439号8号楼, Shanghai (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 俞强(YU, Qiang) [US/CN]; 张怡轩(ZHANG, Yixuan) [CN/CN]; 张婷(ZHANG, Ting) [CN/CN]; 周文亮(ZHOU, Wenliang) [CN/CN]; 中国上海市春晓路439号8号楼, Shanghai (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号徐迅, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护):
AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护):
ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: THERAPEUTIC DRUGS FOR ARTHRITIS

(54) 发明名称: 治疗关节炎的药物

(57) Abstract: The present invention relates to the coumestans compounds extracted from Asteraceae plants, drug compositions comprising the compounds and the use in treatment of rheumatic arthritis or rheumatoid arthritis, osteoarthritis. The animal experiments in vivo or in vitro indicate that coumestans compounds can treat rheumatic arthritis or rheumatoid arthritis, osteoarthritis effectively and alleviate the symptoms.

(57) 摘要

本发明公开了一种从菊科植物中提取的香豆草醚类化合物, 含有该化合物的药物组合物, 及其在治疗风湿性或类风湿性关节炎、骨关节炎症方面的应用。体外和动物体内实验证明, 这类从菊科植物中提取的香豆草醚类化合物可有效治疗和改善风湿性或类风湿性关节炎、骨关节炎症的症状。

WO 2005/067920 A1

治疗关节炎的药物

技术领域

5 本发明涉及一种从菊科植物中提取的香豆草醚类化合物，含有该化合物的药物组合物或者保健品，及其在治疗风湿性或类风湿性关节炎、骨关节炎症方面的应用。

背景技术

10 关节炎系指关节罹患炎症，其致病原因复杂，发病形式多样。但以类风湿性关节炎、骨关节炎最为常见。类风湿性关节炎是一种常见的以慢性多关节炎为主要表现的疾病，其特征为慢性、进行性、对称性及侵蚀性的外周关节损害，病理变化为关节滑膜细胞增生、扩张、充血，血管壁肥厚，炎细胞浸润，纤维组织增生、透明、变性等，可伴有关节外的系统性损害。关于类风湿性关节炎的发病机理至今尚未明确，细菌、病毒、性激素、遗传、环境等因素均可能与之有关，也与机体素质有一定关系(William PA. The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheumatism 15 1997;40(4);595-597)，即与遗传基因相关。

一般认为，下面的假设可说明两者间的相互作用：(1)HLA可以作为某些病原体的受体；(2)病原体的抗原片断与HLA分子的氨基酸进行结合；(3)分子模拟作用，既与疾病相关的HLA分子和病原体具有相似结构的基因片段，如 HLA-DR₄某些与EB病毒壳抗原(gp110)间则有一段相同的氨基酸，使抗体对病原体的反应转为对其自身抗原的免疫反应。当抗原进入人体后首先被巨嗜细胞或巨嗜样细胞所吞噬，经消化、浓缩后与其细胞膜的HLA-DR分子结合成复合物，若此复合物被其T细胞的受体所识别，则该T辅助淋巴细胞被活化，20 因其一系列的免疫反应，包括激活B淋巴细胞，使其分化为浆细胞，分泌大量免疫球蛋白，其中有类风湿因子，70%患者血清中出现类风湿因子。类风湿因子是免疫球蛋白IgG Fc端的抗体，它与自身的IgG相结合，形成免疫复合物是造成关节局部和关节外病变的重要因素之一，故类风湿性关节炎是自身免疫性疾病。同时免疫调节和淋巴细胞亚群间相互作用失调也是病因之一。30 其病理表现为关节的滑膜炎，当累及软骨和骨质时出现关节畸形。

类风湿性关节炎被视为影响人类健康的五大疾病之一，据WHO统计，全球有1%的人患有类风湿性关节炎病，中国的患者已达一千余万。在发病后10年内近50%的患者失去工作能力，生活质量下降，严重者甚至导致死亡(李克江等“近几年开发的类风湿性关节炎治疗药物”《国外医药抗生素分册》2003 35 Jan.24(1)24-29)。

骨关节炎的名称极多，如肥大性骨关节炎、退行性关节炎、变性性关节炎、增生性骨关节炎或骨关节病，均指一种病、国内统一使用骨关节炎。该病是一种最常见的关节病变，其患病率随着年龄而增加，是一种常见的老年人的关节炎。据世界卫生组织统计，全世界50岁以上的人中，骨关节炎的发病率为50%，55岁以上的人群中，发病率为80%，因此，骨关节炎又被称为“下半生疾病”。65岁以上的老人几乎都有这种疾病。其病因尚不完全清楚，其发病可能与机械影响和衰老导致生理改变等综合因素如肥胖、骨密度、外伤和遗传等因素所致。

关节炎大多呈慢性、进行性病变过程，需要长期应用药物治疗。关节炎治疗的基本目标在于减轻疼痛、减少发炎、防止骨骼、软骨及软组织受破坏，维持关节的正常功能，使病人日常活动不受影响。在药物治疗方面，传统上是采用「金字塔」形状的治疗方式，即循序地使用一线、二线以至三线药物。

一线药物—非甾体抗炎药 (NSAIDs)

典型的非甾体抗炎药 (NSAIDs) 是当前治疗关节炎的主要药物，在关节炎的早期阶段能有效地通过抑制环氧化酶 (COX) 抑制前列腺素的合成而迅速产生抗炎止痛作用，对减轻急性关节炎的症状和体征有较好效果，但不能改变疾病的病程。目前这一类药物品种较多，主要有：阿西美辛、双氯芬酸钠、布洛芬、吲哚美辛、美洛昔康、酮洛芬、舒林酸、金诺芳、萘普生、萘丁美酮、吡罗昔康、甲氯灭酸、氯灭酸、甲灭酸、吡洛芬、芬布芬、托美汀、氟灭酸、非诺芬、舒筋灵，尼美舒利、赛利克西、罗非克西等。非甾体类抗炎药 (NSAIDs) 是治疗关节炎的一线药物，在治疗中举足轻重。关于它们的使用效果，医生和病人均有不同的看法，但是不容忽视的是这类药物都有难以克服的毒副反应。因为上述药物同时抑制COX-1和COX-2的产生，导致很多严重的不良反应，最突出的就是胃肠道并发症、胃部不适及胃出血、溃疡、穿孔，还有肾脏、肝脏、血液系统的损害。老年人由于胃肠、肾功能的生理退化，这方面表现尤甚。在英国，治疗类风湿性关节炎的年总成本估计3500万英镑，而治疗由这些药物产生的毒副作用却花费5800万英镑，若加上由于改善类风湿性关节炎的药物 (DMARDs) 产生毒副作用而频繁监测的费用，约相当于三倍 NSAIDs 的费用。

新上市的NSAIDs如美洛昔康 (meloxicam)、醋氯芬酸 (aceclofenac) 虽然疗效未有大的提高，但最突出的优点就是胃肠道不良反应明显减轻，耐受性进一步提高。

二线药物—慢作用抗风湿药 (DMARDs)

此类药物过去名为“病情改善药 (DMARD)”或“二线药物”，它们对类风湿性关节炎滑膜炎的作用较为缓慢，在应用一段时间后方有效果，而疗效在停

药后可持续一段时间。常见品种有甲氨蝶呤(MTX)、金制剂、柳氮磺吡啶、青霉胺、氯喹、雷公藤等。此外还有细胞毒药物, 此类药物通过不同途径产生免疫抑制作用。常用的有环孢素、环磷酰胺、甲氨蝶呤、雷公藤等。它们往往是系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎和血管炎的二线药物, 副作用虽多且较严重, 但对改善这些疾病的预后有很大的作用。来氟米特(leflunomide)是1998年9月10日经FDA批准在美国首次上市的类风湿性关节炎治疗药物。本品是参与嘧啶合成的二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)可逆性抑制剂, 它选择性地作用于淋巴细胞, 抑制淋巴细胞的增生, 使病情进程显著延缓, 并干扰病程的各个阶段。其等效或优于现有的关节炎缓解剂甲氨蝶呤和柳氮磺胺吡啶, 并且起效快, 有良好的安全性。但是其能引发的不良反应有腹泻、脱发、药疹, 因肝酶(ALT和AST)升高而需要监测肝功能。

三线药物—肾上腺皮质激素

本类药物是强的抗炎、抗过敏药物, 明显改变结缔组织病变的预后, 但不能根治这些疾病。其副作用随作用时间而剂量增加, 故应用时要衡量它的疗效和副作用而慎重选用。甾体类抗炎药主要为糖皮质激素, 如可的松、泼尼松龙等。

此外, 生物制剂用于治疗关节炎的药物有 TNF- α 抗体、 γ -干扰素、RA疫苗等; 其它的治疗方式还有中药治疗、放射治疗及基因治疗等(王斌等 类风湿性关节炎治疗进展 山西医药杂志 2001 Feb. 30(1)34—38)。虽然现有的关节炎治疗药物种类众多, 但至今尚无确切根治或控制关节炎病情发展, 特别是针对类风湿及风湿性关节炎、骨关节炎的药物。而且当前常用的非甾体抗炎药常有胃肠道副作用, 且有时治疗关节炎的疗效不明显, 如苯胺类药物对乙酰氨基酚等; 改善病情类药物在治疗疾病的同时常会有其它系统的副作用, 如肝肾毒性等; 糖皮质激素虽然疗效好, 但会导致感染、骨质疏松、医源性肾上腺皮质机能不全等严重不良反应, 因此不适合长期应用。其它的治疗药物也存在疗效不确切、起效慢、副作用大等缺点。

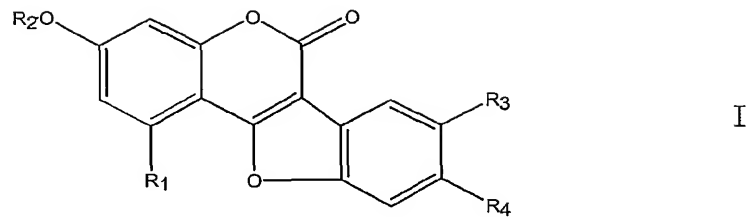
综上所述, 目前市场上缺乏起效快速、缓解关节病痛、副作用小的药物。因此, 本领域迫切需要开发一种疗效好、副作用小的关节炎治疗药物, 尤其是来源于天然植物的有关节炎治疗价值的新物质。

发明内容

本发明的目的就是提供一类可有效治疗关节炎的香豆草醚类化合物。

在本发明的第一方面, 提供了一种式 I 的香豆草醚类化合物或其药学上可接受的盐, 或者含式 I 的香豆草醚类化合物或其药学上可接受的盐的提取

物的用途，



式中，

R₁ 代表氢原子、羟基、甲氧基；

5 R₂ 代表氢原子、羟基、C₁-C₈ 烷基；

R₃ 和 R₄ 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基；

其特征在于，被用于制备治疗或预防关节炎病的药物。

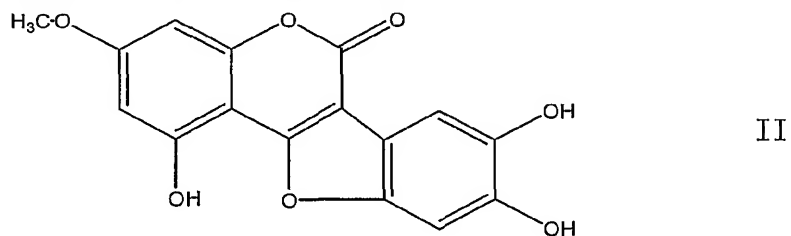
在另一优选例中，所述的药学上可接受的盐是式 I 化合物与选自下组的酸所形成的盐：氢氯酸、氢溴酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、或羟乙磺酸。

10

在另一优选例中，所述的式 I 化合物或所述的提取物是从菊科植物中提取的。

在另一优选例中，所述的菊科植物选自鳢肠 (*Eclipta prostrata* Linn)、
15 蟛蜞菊 (*Wedelia chinensis*) 或旱莲草 (*Eclipta alba*)、或其组合。

在另一优选例中，所述的式 I 化合物是具有式 II 的蟛蜞菊内酯：



在另一优选例中，所述的关节炎病选自下组：风湿性或类风湿性关节炎、骨关节炎。

在另一优选例中，式 I 化合物是通过化学全合成、化学半合成或用生物
20 转换的方式获得的。

在另一优选例中，所述式 I 化合物是通过包括以下步骤的提取方法获得的：

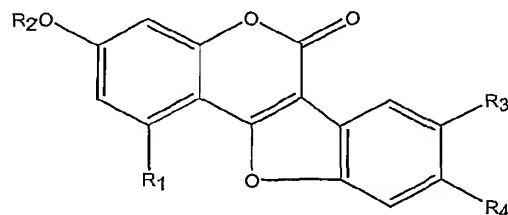
(a) 用 95±3% 乙醇提取菊科植物的果实、叶或枝，得到乙醇浸膏；

(b) 取乙醇浸膏，用 5-300 倍 (较佳地 10-200 倍，更佳地 20-100 倍) 于
25 浸膏体积的 50-80℃ 的水溶解，过滤去除杂质，回收水相；

- (c) 用乙酸乙酯萃取步骤(b)的水相, 回收乙酸乙酯相;
 (d) 对步骤(c)的乙酸乙酯相进行干燥, 得到沉淀物;
 (e) 在硅胶柱上, 用梯度为 5:1 至 1:2 的石油醚/丙酮洗脱剂进行洗脱步骤(c)的沉淀物, 收集石油醚: 丙酮为 1:1 的洗脱组分;
 5 (f) 对步骤(e)的洗脱组分进行浓缩, 得浓缩物;
 (g) 在硅胶柱上, 用梯度为 5:1 至 1:2 的二氯甲烷/丙酮洗脱剂洗脱步骤(f)的浓缩物, 收集二氯甲烷: 丙酮为 3:1 的洗脱组分;
 (h) 在硅胶柱上, 用梯度为 20:10:1 至 5:10:1 的甲苯-丙酮-甲酸洗脱剂洗脱步骤(g)的洗脱组分, 收集甲苯: 丙酮: 甲酸为 10:10:1 的洗脱组分;
 10 (i) 在硅胶柱上, 用梯度为 30:1 至 1:1 的二氯甲烷/甲醇洗脱剂洗脱步骤(h)的洗脱组分, 收集二氯甲烷: 甲醇为 20:1 的洗脱组分;
 (j) 用乙醇进行重结晶, 得到式 I 的香豆草醚类化合物沉淀。

在本发明的第二方面, 提供了一种制备香豆草醚类化合物的方法, 包括以下步骤:

- 15 (a) 用 $95 \pm 3\%$ 乙醇提取菊科植物的果实、叶或枝, 得到乙醇浸膏;
 (b) 取乙醇浸膏, 用 5-300 倍 (较佳地 10-200 倍, 更佳地 20-100 倍) 于浸膏体积的 $50-80^{\circ}\text{C}$ 的水溶解, 过滤去除杂质, 回收水相;
 (c) 用乙酸乙酯萃取步骤(b)的水相, 回收乙酸乙酯相;
 (d) 对步骤(c)的乙酸乙酯相进行干燥, 得到沉淀物;
 20 (e) 在硅胶柱上, 用梯度为 5:1 至 1:2 的石油醚/丙酮洗脱剂进行洗脱步骤(c)的沉淀物, 收集石油醚: 丙酮为 1:1 的洗脱组分;
 (f) 对步骤(e)的洗脱组分进行浓缩, 得浓缩物;
 (g) 在硅胶柱上, 用梯度为 5:1 至 1:2 的二氯甲烷/丙酮洗脱剂洗脱步骤(f)的浓缩物, 收集二氯甲烷: 丙酮为 3:1 的洗脱组分;
 25 (h) 在硅胶柱上, 用梯度为 20:10:1 至 5:10:1 的甲苯-丙酮-甲酸洗脱剂洗脱步骤(g)的洗脱组分, 收集甲苯: 丙酮: 甲酸为 10:10:1 的洗脱组分;
 (i) 在硅胶柱上, 用梯度为 30:1 至 1:1 的二氯甲烷/甲醇洗脱剂洗脱步骤(h)的洗脱组分, 收集二氯甲烷: 甲醇为 20:1 的洗脱组分;
 (j) 用乙醇进行重结晶, 得到式 I 的香豆草醚类化合物沉淀



I

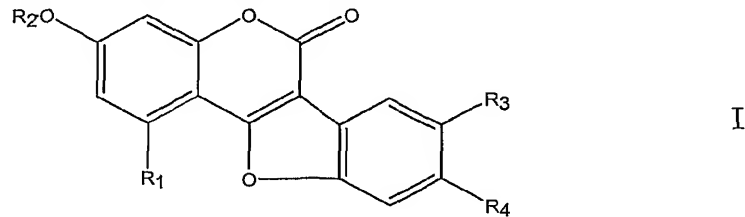
30 式中,

R₁ 代表氢原子、羟基、甲氧基；

R₂ 代表氢原子、羟基、C₁-C₈ 烷基；

R₃ 和 R₄ 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基。

在本发明的第三方面，提供了一种保健品，它含有 0.05-50wt% (固定夹
5 0.1-10wt%) 的式 I 化合物或其药学上可接受的盐



式中，

R₁ 代表氢原子、羟基、甲氧基；

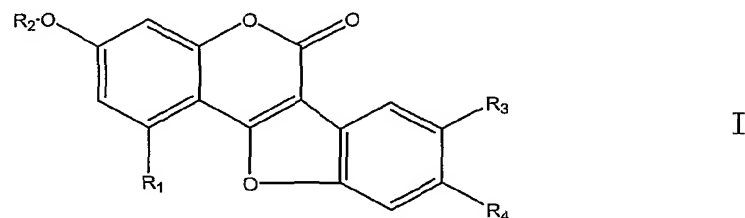
R₂ 代表氢原子、羟基、C₁-C₈ 烷基；

R₃ 和 R₄ 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基；

10 和食品上可接受的载体。

在本发明的第四方面，提供了一种治疗关节炎的药物组合物，它含有

(a) 含有作为主要活性成分的 0.05-90wt% 的式 I 化合物或其药学上可接受
的盐，或者含式 I 的香豆草醚类化合物或其药学上可接受的盐的提取物



式中，

15 R₁ 代表氢原子、羟基、甲氧基；

R₂ 代表氢原子、羟基、C₁-C₈ 烷基；

R₃ 和 R₄ 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基；

(b) 选自下组的一种或多种辅助活性成分：阿西美辛、双氯芬酸钠、布
洛芬、吲哚美辛、美洛昔康、酮洛芬、舒林酸、金诺芳、蔡普生、蔡丁美酮、
20 吡罗昔康、甲氯灭酸、氯灭酸、甲灭酸、吡洛芬、芬布芬、托美汀、氟灭酸、
非诺芬、舒筋灵，尼美舒利、赛利克西、罗非克西、醋氯芬酸；甲氨蝶呤、
金制剂、柳氮磺吡啶、青霉胺、氯喹、雷公藤、环孢素、环磷酰胺；或糖皮
质激素；和

(c) 药学上可接受的载体。

25

附图说明

图1显示了佐剂性关节炎病变大鼠，可见左脚原发性的炎症和右脚继发性的炎症。

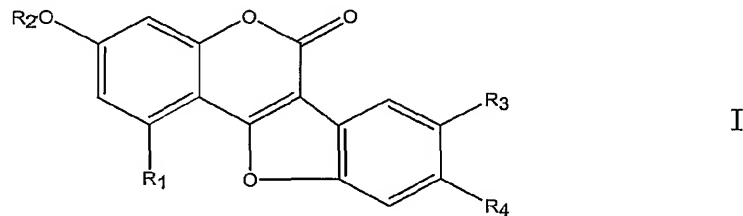
图2显示了MTX对佐剂性关节炎的治疗，可见左脚原发性的炎症和右脚继发性的炎症均减轻。

图3显示了蟛蜞菊内酯(12.5 mg/kg)对佐剂性关节炎的治疗，可见左脚原发性的炎症和右脚继发性的炎症均减轻。

图4显示了蟛蜞菊内酯(0.25 mg/kg)对佐剂性关节炎的治疗，可见左脚原发性的炎症和右脚继发性的炎症有减轻趋势。

具体实施方式

本发明人经过广泛和深入的研究，发现式 I 的香豆草醚类化合物或其药学上可接受的盐，或者含式 I 的香豆草醚类化合物或其药学上可接受的盐的提取物可有效地治疗关节炎，



式中，

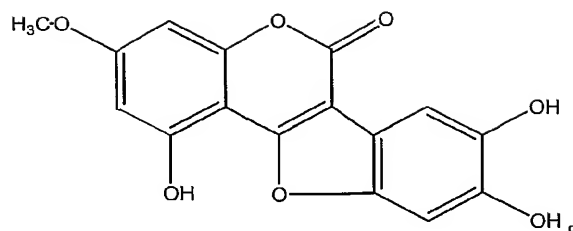
R_1 代表氢原子、羟基、甲氧基；

R_2 代表氢原子、羟基、 C_1-C_8 烷基；

R_3 和 R_4 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基。在此基础上完成了本发明。

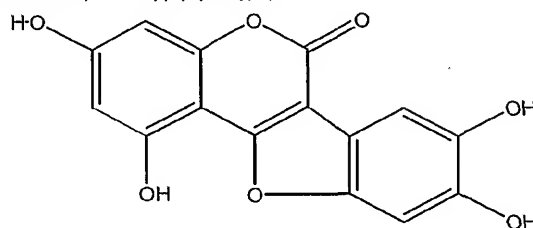
式I化合物，可由植物中提取或化学合成、半合成、生物转化的方式获得，例如从菊科植物鳢肠 (*Eclipta prostrata* Linn)、蟛蜞菊 (*Wedelia chinensis*)、或旱莲草 (*Eclipta alba*) 等植物中提取。该化合物在菊科植物中的提取部位为植物的枝、叶或果实部位，尤其是叶部位。

1956年，Govindachari等首次从 *Wedelia calendulacea* 中分离出香豆草醚类成分蟛蜞菊内酯 (wedelolactone)，其结构为



(Govindachari et.al. "Chemical Examination of Wedelia Calendulacea, Part I, Structure of Wedelolactone", Journal of the Chemical Society (1956), pp. 629-632.; Govindachari et.al. "Chemical Investigation of Wedelia Calendulacea, Part II, The Position of the Methoxyl Group in Wedelolactone", Journal of the Chemical Society, (1957), 545-547;).

其后 Bhargava 等从旱莲草 (*Eclipta alba*) 中分离出去甲蟛蜞菊内酯 (demethylwedelolactone), 结构式为:

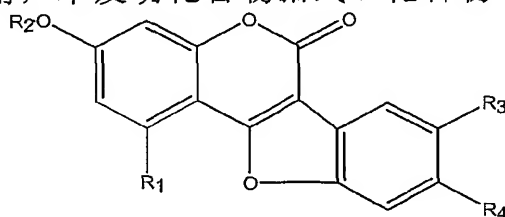


(Bhargava KK. et. al Isolation of desmethylwedelolactone and its glucoside from *Eclipta alba*. Indian J Chem, 1970, 8(7):664-665).

Li CC. 等及美国专利 6,552,071 公开了该类化合物衍生物的结构及合成方法。(Li CC. et. al Total synthesis of wedelolactone. J Org Chem. 2003 Oct 31; 68(22):8500-4.) (Yuan et al. Methods for treating cell death diseases and inflammation. United States Patent 6,552,071).

该类化合物以往被认为有护肝、止血、抗蛇毒等作用。(Wong et.al. "Wedelolactone and coumestan derivatives as new antihepatotoxic and antiphlogistic principles. Arzneimittelforschung. 1998 May 38(5):661-5; Melo. et.al. "Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* extracts and constituents. Toxicon. 1994 May; 32(5):595-603).

如本文所用, 本发明化合物指式 I 化合物



I

其中, R_1 代表氢原子、羟基、甲氧基;

R_2 代表氢原子、羟基、 C_1 - C_8 烷基;

R_3 - R_4 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基。

如本文所用, 烷基是指具有 1~8 个碳原子的直链或支链的烷基, 例如
5 甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、戊基、新戊基、己基、庚基、辛基等。优选具有 1~4 个碳原子的直链或支链的烷基。最优选甲基。

本发明的化合物可以以由药学上或生理学可接受的酸或碱衍生的盐形式使用。这些盐包括(但不限于)与如下酸形成的盐: 氢氯酸、氢溴酸、硫酸、
10 柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、或羟乙磺酸。卤化物的盐同样适用。其他盐包括: 与碱金属或碱土金属(如钠、钾、钙或镁)形成的盐, 以及以酯、氨基甲酸酯或其他常规的“前体药物”的形式(当以这种形式给药时, 在体内可转化成活性部分)。

15 含有式 I 化合物的提取物也可用于本发明。一种优选的提取方法如上所述。通常, 在提取物中式 I 化合物的纯度按重量计应在 40%-99.9%, 更佳地为 50-98%。

本发明还包括药物组合物以及治疗关节炎的方法, 它包括给哺乳动物施用药物有效量的本发明化合物。

20 本发明的香豆草醚类化合物可用于治疗关节炎。代表性的例子包括(但不限于): 风湿性或类风湿性关节炎、骨关节炎等。

药物组合物

本发明涉及的药物组合物包含安全有效量的本发明涉及的化合物和药
25 物上可接受的载体。“安全有效量”系指在普遍认同的医学判定范畴内, 化合物的用量足以改善待治病情, 且治疗时并未出现严重的副作用。某化合物的安全有效量应根据具体的待治病情、接受治疗的病人的年龄和生理状况、病情严重程度、疗程长短、药用载体及给药途径等因素而确定。此时组合物中包含按重量计约0.1%至约99.9%的化合物。

30 通常, 当本发明化合物用于上述用途时, 它们可与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合, 如溶剂、稀释剂等, 而且可以用如下形式口服给药: 片剂、胶囊、可分散的粉末、颗粒或悬浮液(含有如约 0.05-5%悬浮剂)、糖浆(含有如约 10-50%糖)、和酞剂(含有约 20-50%乙醇), 或者以无菌可注射溶液或悬浮液形式(在等渗介质中含有约 0.05-5%悬浮剂)进行非肠胃给药。

35 例如, 这些药物制剂可含有与载体混合的约 2.5-90%, 通常约为 5%-60%(重量)

的活性成分。

常见的药物剂型包括粒剂、粉剂、片剂、胶囊、糖浆、栓剂、注射剂、乳剂、酞剂、悬浮液、溶液的形式口服或非口服给药。

对于口服给药，可使用片剂、锭剂、胶囊、丸剂、粉末、颗粒、糊剂、
5 混悬剂、乳剂或者溶液剂。

对于非胃肠道给药，可使用注射剂和输液剂。

对于关节内注射，可使用相应配置的混悬剂。

对于肌肉内注射，可使用水溶液和油溶液或者混悬剂以及相应的贮存库制剂。

10 对于体外局部用药，可使用洗剂、霜剂和凝胶剂等。

所用的活性成分的有效剂量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度而变化。然而，通常当本发明的化合物每天以约 0.5-500mg/kg 动物体重的剂量给予时，能得到令人满意的效果，较佳地每天以 2-4 次分开的剂量给予，或以缓释形式给药。对大部分大型哺乳动物而言，每天的总剂量约为 1-
15 100mg。适用于内服的剂量形式，包含与固态或液态药学上可接受的载体混合的约 0.5-500mg 的活性化合物。可调节此剂量方案以提供最佳治疗应答。例如，由治疗状况的迫切要求，可每天给予若干次分开的剂量，或将剂量按比例地减少。通常，成年人的口服每日的合适临床剂量的选择范围为 1-1000mg，优选为 10-200mg，成人非口服的每日剂量为 0.1-100mg，优选 1-100mg。

20 在优选例中，本发明的化合物可通过口服以及静脉内、肌内或皮下途径给药。固态载体包括：淀粉、乳糖、磷酸氢钙、微晶纤维素、蔗糖和白陶土，而液态载体包括：无菌水、聚乙二醇、非离子型表面活性剂和食用油（如玉米油、花生油和芝麻油），只要适合活性成分的特性和所需的特定给药方式。在制备药物组合物中通常使用的佐剂也可有利地被包括，例如调味剂、色素、
25 防腐剂和抗氧化剂如维生素 E、维生素 C、BHT 和 BHA。

如本文所用，“非口服”包括皮下注射，静脉注射，腹膜内注射和滴注输液，使用合适的分散剂或润滑剂及悬浮剂，由本领域常规方法可制得注射制剂如无菌注射的水性或油性悬浮剂，无菌注射的制剂为在稀释剂中或溶液中的无毒、非口服施用的溶液或悬浮剂，例如水溶液，可用的载体或溶剂包
30 括水、等渗盐水、无毒非挥发性油也可用作溶剂或悬浮介质。为此，可以使用任何非挥发油或脂肪酸，包括天然、合成或半合成的脂肪油和脂肪酸以及天然、合成或半合成的单、双或三甘油酯。

直肠用药的栓剂的制备可用药物与一种合适的无刺激性赋形剂混合而成，赋形剂在常温下为固体，而在肠内温度下为液体从而溶解、将药物释放
35 到直肠中，如可可脂或聚乙二醇。

口服用药的固体药剂如上所述，包括粉剂、粒剂、片剂、丸剂、胶囊。这种剂型可用有效组分与至少一种添加剂混合而成，这些添加剂包括蔗糖、乳糖、纤维素糖、甘露醇、麦芽糖、葡聚糖、淀粉、琼脂、藻酸盐、壳质、壳聚糖、果胶、黄耆胶、阿拉伯胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白以及合成或半合成的聚合物和甘油酯，一般这些剂型可含有另外的添加剂，包括惰性稀释剂，润滑剂如硬脂酸镁，防腐剂如对羟苯甲酸酯类，山梨酸，抗氧化剂如维生素 C、 α -维生素 E 和半胱氨酸，分解剂，粘结剂，增稠剂，缓冲液，甜味剂，调味剂和香料。片剂和丸剂也可覆以肠衣。口服的液体剂型包括可药用的乳剂、糖浆、酏剂、悬液和溶液，可以含有常用的惰性稀释剂，如水。

从易于制备和给药的立场看，优选的药物组合物是固态组合物，尤其是片剂和固体填充或液体填充的胶囊。化合物的口服给药是优选的。

在使用本发明化合物治疗风湿性或类风湿性关节炎、骨关节炎时，还可与其他风湿性或类风湿性关节炎、骨关节炎手段或其他治疗剂联用。例如与选自下组的一种或多种辅助活性成分联用：

非甾体抗炎药：阿西美辛、双氯芬酸钠、布洛芬、吲哚美辛、美洛昔康、酮洛芬、舒林酸、金诺芳、萘普生、萘丁美酮、吡罗昔康、甲氯灭酸、氯灭酸、甲灭酸、吡洛芬、芬布芬、托美汀、氟灭酸、非诺芬、舒筋灵，尼美舒利、赛利克西、罗非克西、醋氯芬酸；

慢作用抗风湿药：甲氨蝶呤、金制剂、柳氮磺吡啶、青霉胺、氯喹、雷公藤、环孢素、环磷酰胺；或

肾上腺皮质激素：糖皮质激素，如可的松、泼尼松龙。

本发明的主要优点在于：

本发明找到一类香豆草醚类化合物，它能有效地预防和治疗风湿性和类风湿性关节炎、骨关节炎的作用。与现有治疗药物相比，本发明治疗关节炎地效果更加显著，且对人体毒副作用小。

本发明化合物可将其单独或与其它药物共同作为活性成分制成预防、治疗关节炎的药品或保健品。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1：

旱莲草(*Eclipta alba*)中提取化合物蟛蜞菊内酯。

(1)浸泡及过滤

旱莲草全草300kg, 完全浸入0.75吨乙醇(浓度95%)中→浸泡过夜(10小时) 粗滤, 从而除去全草残渣(保留)净滤(抽滤)或高速离心(10000rpm, 10分钟), 从而除去灰尘及细渣绿色澄清滤液。

5 (2)乙醇回收

蒸馏回收乙醇, 温度不超过60摄氏度每回 馏 2 小时, 将反应釜中的浸膏移出至收集桶中(浸膏呈深墨绿色, 略粘稠状)重复 上述步骤, 直至回收全部乙醇。

(3)二次浸泡及回馏

10 回收乙醇0.75吨, 重新浸泡全草残渣浸泡 过夜, 粗滤、净滤及蒸馏回收要求同前。得到浸膏。

(4)乙酸乙酯萃取

15 取上述浸膏50-80摄氏度(更佳地60-70摄氏度)加热水振荡混匀, 热水加量为浸膏体积的50倍, 抽滤得到热水相液。按照水相: 酯相体积比为1: 1的比例加入萃取用的乙酸乙酯, 充分混匀震荡后, 静置, 待水相/酯相分层。移出乙酸乙酯层, 50摄氏度真空减压蒸馏至干燥, 加入少量乙醇溶解, 置于烧杯中于4摄氏度保存过夜, 底部出现沉淀。减压抽滤获得沉淀, 50摄氏度烘箱干燥, 得到粗品。

(5)产品的分离精制

20 取粗品5g, 拌样于10 g 200~300目硅胶, 进行硅胶柱层析(200 g, 200~300目), 用石油醚-丙酮梯度洗脱, 每100 mL收集一次, 分别得到不同极性部位, 合并(TLC 石油醚-丙酮 1:1, $R_f = 1/3$)的斑点。将合并的组份浓缩后, 再拌样于硅胶进行柱层析, 用二氯甲烷-丙酮梯度洗脱, 每50 mL收集一次, 分别得到不同极性部位, 合并(TLC 二氯甲烷-丙酮 3:1, $R_f = 1/6$)的斑点。
25 将合并的组份浓缩后, 再拌样于硅胶进行柱层析, 用甲苯-丙酮-甲酸梯度洗脱, 每50 mL收集一次, 分别得到不同极性部位, 合并(TLC 甲苯-丙酮-甲酸 10:10:1, $R_f = 1/2$)的斑点。将合并的组份浓缩后, 再拌样于硅胶进行柱层析, 用二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 每25 mL收集一次, 分别得到不同极性部位, 合并(TLC二氯甲烷-甲醇20:1, $R_f = 1/6$)的斑点。得到纯度> 90%的产品, 收
30 率约1%。

(6)标准品精制

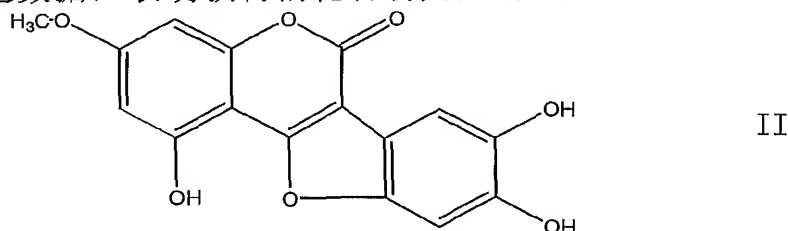
35 将纯度> 90%的样品30 mg溶于70%甲醇中, 用Lichroprep RP-18(40 ~63 μ)柱进行反相洗脱, 用TLC检测, 收集70%洗脱下来的样品, 合并得到纯度> 98%的标准品。收率约90%。标准品的性状、分子式、熔点和IR, EIMS, $^1\text{HNMR}$,

¹³CNMR峰的归属如下:

灰白色粉末, 分子式: C₁₆H₁₀O₇, mp 315°C (分解), UV λ_{max} (MeOH, nm): 211.5 (4.65), 247 (4.40), 304 (4.01) (sh), 350 (4.48)。IR (KBr) cm⁻¹ 3300, 1715, 1640, 1620, 1445, 1415, 1320, 1205, 1155, 1070。EIMS m/z (%): 314 (M⁺, 100), 313 (22), 299 ([M-CH₃], 28), 285 (5), 271 ([M-CH₃-CO], 8), 243 ([M-CH₃-CO-CO], 28), 187 (17), 69 (42)。¹HNMR (δ): 7.23 (s), 7.14 (s), 6.58 (d, J=2.3 Hz), 6.42 (d, J=2.3 Hz), 3.90 (s)

¹³CNMR (δ): 158.0 (C-1), 101.1 (C-2), 159.6 (C-3), 95.6 (C-4), 99.3 (C-5), 161.1 (C-6), 95.0 (C-7), 155.5 (C-8), 155.0 (C-9), 104.7 (C-10), 145.2 (C-11), 144.3 (C-12), 99.0 (C-13), 114.0 (C-14), 148.7 (C-15), 55.7 (C-16)。

综合上述数据, 表明获得的化合物是具有式II的蟛蜞菊内酯:



实施例2

化合物蟛蜞菊内酯对小鼠二甲苯致耳片炎症的抑制作用

实验动物: 昆明种小鼠, 体重18-22g。

给药方式: 腹腔注射给药, 蟛蜞菊内酯的剂量分别为12.5 mg/kg, 25 mg/kg, 阴性对照组为0.5% CMC, 阳性对照组布洛芬, 剂量为25 mg/kg。

实验方法: 按体重将动物随机分成4组, 每组10只。小鼠连续给受试物4天, 第4天给药1小时后用50 μl二甲苯均匀涂抹于小鼠右耳两侧, 左耳不做处理。放置2小时后, 小鼠脱臼处死, 以8 mm内径的打孔器取双耳相同位置的耳片, 称重。以小鼠左右耳片重量之差做为指标, 评价药物对炎症的影响。

结果:

试验结果见表1, 说明蟛蜞菊内酯能对抗二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症反应。

表1 蟛蜞菊内酯对二甲苯所致小鼠急性炎症的影响。(mg, $\bar{x} \pm SD$)

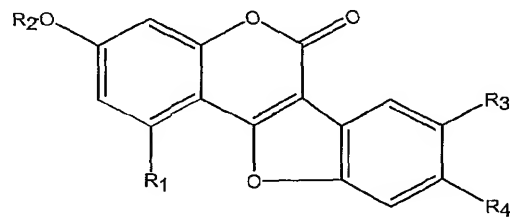
组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	动物数 (n)	左右耳差值 (mg)
0.5% CMC	—	10	18.3 ± 3.3
布洛芬	25	10	11.4 ± 3.6**
蟛蜞菊内酯-12.5 mg/kg	12.5	10	11.3 ± 3.6**
蟛蜞菊内酯-25 mg/kg	25	10	10.9 ± 4.6**

“**”表示 $p < 0.01$

实施例3

5 式(I)化合物对大鼠角叉菜胶致足趾炎症的抑制作用

参照文献(Wong et.al."Wedelolactone and coumestan derivatives as new antihepatotic and antiphlogistic principles. Arzneimittelforschung. 1998 May 38(5):661-5;)的合成方法合成化合物1、2和3。



I

- 10 其中, 化合物1: $R_1=R_2=H$ $R_3=R_4=OH$
 化合物2: $R_1=OH$ $R_2=CH_3$ $R_3=R_4=OH$
 化合物3: $R_1=OH$ $R_2=CH_3$ $R_3=Cl$ $R_4=OH$

实验动物: Wistar雄性大鼠, 体重200g左右。

- 15 给药方式: 腹腔注射给药, 化合物1、化合物2及化合物3的剂量分别为12 mg/kg, 阴性对照组为0.5% CMC。阳性对照组布洛芬, 剂量为25 mg/kg。

实验方法: 按体重将动物随机分成4组, 每组10只。分别为阴性对照组, 阳性对照组, 化合物1、化合物2及化合物3剂量组。每天给药1次, 连续给药7天, 末次给药后30 min, 于大鼠右后足趾腱膜下注入1%的角叉菜胶0.1 ml, 然后测定致炎后不同时间足肿胀的程度。

20

结果:

试验结果见表2。化合物1、化合物2及化合物3能抑制大鼠角叉菜胶性肿胀

表2 式(I)化合物对角叉菜胶致大鼠足肿胀的影响(n=10, $\bar{x} \pm SD$)

组别	致炎后不同时间肿胀度(ml)				
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
0.5% CMC	0.46±0.07	0.51±0.11	0.59±0.10	0.61±0.07	0.51±0.09
布洛芬	0.31±0.06***	0.38±0.10***	0.42±0.11***	0.39±0.06***	0.37±0.07***
化合物1	0.38±0.05***	0.43±0.06**	0.47±0.09***	0.53±0.08**	0.43±0.07**
化合物2	0.29±0.06***	0.37±0.09***	0.42±0.07***	0.40±0.05***	0.39±0.08***
化合物3	0.31±0.06***	0.34±0.09***	0.38±0.07***	0.42±0.05***	0.41±0.08***

“***”表示 $p < 0.001$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有极为显著性差异。

“**”表示 $p < 0.01$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有非常显著性差异。

5 实施例4

化合物螞蟥菊内酯对大鼠佐剂性关节炎的作用

实验动物: Wistar雄性大鼠, 体重150g左右

给药方式: 腹腔注射给药, 螞蟥菊内酯的剂量分别为0.25 mg/kg, 12.5 mg/kg, 用0.5%的CMC配制, 氨甲喋呤的剂量为0.2 mg/kg。

10 实验方法: 按体重将动物随机分成4组。适应性饲养3天后用于试验。每只大鼠左后足拓皮内注射CFA乳液0.1 ml致炎, 给佐剂后第10天给受试药螞蟥菊内酯和对照组, 按5 ml/kg体积腹腔注射给药。连续给药19天。从给佐剂当天开始, 每天用游标卡尺测定四支脚爪的厚度变化, 毛细管放大测量装置测量后爪体积变化。选取给药后第5、10、15、19天的值做统计分析。

15

结果:

试验结果见表3-8和图1-4。可见典型的关节炎大鼠和治疗前后的比较, 说明螞蟥菊内酯能对抗佐剂引起的关节炎。

(1) Wistar大鼠四只脚爪的厚度变化

20 表3 Wistar大鼠给药后第5、10、15、19天的左前爪厚度(mm, $\bar{x} \pm SD$)

组别/厚度(左前)	动物数	第5天	第10天	第15天	第19天
0.5%CMC	10	4.24±0.19	4.71±0.25	4.86±0.37	4.90±0.24
氨甲喋呤	10	4.14±0.14	3.96±0.10**	4.04±0.10**	4.09±0.11**
螞蟥菊内酯-0.25	10	4.20±0.11	4.71±0.24	4.61±0.10	4.64±0.17**
螞蟥菊内酯-12.5	10	4.11±0.11	4.03±0.13**	4.11±0.16**	4.04±0.14**

“***”表示 $p < 0.01$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有非常显著性差异。

表4 Wistar大鼠给药后第5、10、15、19天的右前爪厚度(mm, $\bar{x} \pm SD$)

组别/厚度(右前)	动物数	第5天	第10天	第15天	第19天
0.5%CMC	10	4.17 \pm 0.22	4.66 \pm 0.36	4.79 \pm 0.39	4.89 \pm 0.31
氨甲喋呤	10	4.00 \pm 0.10	3.84 \pm 0.10**	4.07 \pm 0.13**	4.00 \pm 0.12**
螞蟥菊内酯-0.25	10	4.13 \pm 0.15	4.66 \pm 0.09	4.54 \pm 0.15	4.59 \pm 0.15*
螞蟥菊内酯-12.5	10	4.01 \pm 0.17	3.95 \pm 0.12**	4.11 \pm 0.16**	4.04 \pm 0.07**

“**”表示 $p < 0.01$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有非常显著性差异。

“*”表示 $p < 0.05$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有显著性差异。

5 表5 Wistar大鼠给药后第5、10、15、19天的左后爪厚度(mm, $\bar{x} \pm SD$)

组别/厚度(左后)	动物数	第5天	第10天	第15天	第19天
0.5%CMC	10	7.26 \pm 0.85	8.64 \pm 0.69	8.83 \pm 0.53	9.07 \pm 0.28
氨甲喋呤	10	6.96 \pm 1.97	7.44 \pm 1.42	7.86 \pm 1.36	7.51 \pm 1.40*
螞蟥菊内酯-0.25	10	7.10 \pm 0.83	8.18 \pm 1.22	8.51 \pm 0.91	8.49 \pm 1.06
螞蟥菊内酯-12.5	10	7.13 \pm 0.96	8.09 \pm 1.05	8.44 \pm 1.63	8.53 \pm 1.33

“*”表示 $p < 0.05$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有显著性差异。

表6 Wistar大鼠给药后第5、10、15、19天的右后爪厚度(mm, $\bar{x} \pm SD$)

组别/厚度(右后)	动物数	第5天	第10天	第15天	第19天
0.5%CMC	10	5.2 \pm 0.23	5.44 \pm 0.30	5.46 \pm 0.54	5.57 \pm 0.20
氨甲喋呤	10	4.89 \pm 0.23*	4.87 \pm 0.18**	5.04 \pm 0.28	4.90 \pm 0.08**
螞蟥菊内酯-0.25	10	5.05 \pm 0.24	5.28 \pm 0.38	5.15 \pm 0.35	5.23 \pm 0.23**
螞蟥菊内酯-12.5	10	4.95 \pm 0.27	5.05 \pm 0.25*	5.20 \pm 0.23	4.98 \pm 0.10**

“**”表示 $p < 0.01$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有非常显著性差异。

10 “*”表示 $p < 0.05$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有显著性差异。

(2) Wistar大鼠两只脚后爪的体积变化

表7 Wistar大鼠给药后第5、10、15、19天的左后爪体积变化(ml)

组别/体积(左后)	动物数	第5天	第10天	第15天	第19天
0.5%CMC	10	1.90 \pm 0.24	2.55 \pm 0.25	2.89 \pm 0.43	2.70 \pm 0.44
氨甲喋呤	10	1.68 \pm 0.32	1.73 \pm 0.23**	1.93 \pm 0.34**	1.84 \pm 0.26**
螞蟥菊内酯-0.25	10	1.85 \pm 0.24	2.38 \pm 0.30	2.63 \pm 0.37	2.61 \pm 0.42
螞蟥菊内酯-12.5	10	1.64 \pm 0.31	2.14 \pm 0.45*	2.42 \pm 0.62	2.46 \pm 0.75

“**”表示 $p < 0.01$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有非常显著性差异。

15 “*”表示 $p < 0.05$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有显著性差异。

表8 Wistar大鼠给药后第5、10、15、19天的右后爪体积变化(ml)

组别/体积(右后)	动物数	第5天	第10天	第15天	第19天
0.5%CMC	10	1.19±0.08	1.29±0.09	1.47±0.24	1.55±0.17
氨甲喋呤	10	1.09±0.07*	1.00±0.10**	1.17±0.11*	1.19±0.09**
螞蟥菊内酯-0.25	10	1.18±0.05	1.16±0.08*	1.29±0.13	1.36±0.12*
螞蟥菊内酯-12.5	10	1.10±0.10	1.03±0.10**	1.24±0.16	1.19±0.08**

“**”表示 $p<0.01$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有非常显著性差异。

“*”表示 $p<0.05$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有显著性差异。

5

实施例5

化合物螞蟥菊内酯对胶原诱导的大鼠关节炎的影响

实验动物：Wistar雄性大鼠，体重120g左右。

给药方式：腹腔注射给药，螞蟥菊内酯的剂量分别为6，12 mg/kg，阴性
10 对照组为0.5% CMC。

实验方法：1)制备II型胶原，在4摄氏度中将新鲜小牛关节软骨捣碎，用
Tris-HCL₂浸泡洗涤得残渣，再用胃蛋白酶消化，取上清液盐析出胶原，过
DE-52柱得到II型胶原蛋白。取冰醋酸溶解的II型胶原加入氟氏佐剂研磨乳
15 化，除模型空白组外，每只动物于尾根部、颈背部皮内多点注入胶原共2.5
mg/kg。7天后再于尾根部、颈背部皮内注射胶原1.0 mg/kg作加强免疫。按体
重将动物随机分成4组，每组10只。分别为模型空白组，模型对照组，螞蟥菊
内酯低、高两剂量组。每鼠于第1次免疫后第10天开始给药，每天1次，连续3
20 周，观察药物对类风湿性关节炎的治疗作用及对迟发性超敏反应的影响。从
第1次免疫后第10天开始，每隔10天观察下述指标：A、关节炎表面温度：用
数字体温计测量双后肢踝关节表面温度，计算造模后温度差值。B、关节炎
积分：按文献给大鼠计分，1分：足爪或足垫单个区域炎症，2分：足爪或足
垫两个以上区域炎症，3分：整个肢体的轻度炎症，4分：引起关节强直、畸
形、功能障碍的重度炎症，每足最高积分为4分，每鼠的总积分为16分。C、
迟发性超敏反映观察：第24天时每鼠右耳背部皮下注射含II型胶原10 μ l，
25 用测厚仪测量注射前及注射48 h右耳厚度。

结果：

试验结果见表9-12，说明螞蟥菊内酯能抑制胶原诱导的关节炎。

表9 螞蟥菊内酯对胶原诱导性关节炎大鼠踝关节表面温度的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	关节数 (只)	致炎前温度 (°C)	不同时间踝关节表面温度差值(°C)		
			第10天	第20天	第30天
模型空白组	20	27.40±0.75	-0.01±0.36***	0.01±0.37***	0.01±0.37***
模型对照组	20	27.32±0.68	1.35±0.65	1.60±0.62	1.76±0.81
螞蟥菊内酯-6	20	27.29±0.72	1.42±0.74*	0.83±0.44***	0.72±0.40**
螞蟥菊内酯-12	20	27.36±0.66	1.36±0.50*	0.73±0.45***	0.48±0.39***

“***”表示 $p < 0.001$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有极为显著性差异。

“**”表示 $p < 0.01$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有非常显著性差异。

“*”表示 $p < 0.05$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有显著性差异。

5

表10 螞蟥菊内酯对II胶原诱导性关节大鼠炎症积分的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	动物数 (只)	不同时间的炎症积分		
		第10天	第20天	第30天
模型空白组	10	0.00 ±0.00***	0.00 ±0.00***	0.00 ±0.00***
模型对照组	10	3.80 ±1.90	5.60±1.85	5.90±1.92
螞蟥菊内酯-6	10	4.00±2.02*	3.10±1.45***	2.7±1.35***
螞蟥菊内酯-12	10	4.10±2.08*	2.00±1.41***	1.40±1.02***

“***”表示 $p < 0.001$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有极为显著性差异。

“**”表示 $p < 0.01$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有非常显著性差异。

“*”表示 $p < 0.05$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有显著性差异。

10

表11 螞蟥菊内酯对II胶原诱导性关节大鼠迟发型超敏反应的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	动物数 (只)	注射前右耳厚度 (mm)	右耳厚度增长值 (mm)
模型空白组	10	0.752 ±0.101*	0.002 ±0.026***
模型对照组	10	0.784 ±0.072	0.403±0.183
螞蟥菊内酯-6	10	0.793±0.071*	0.231±0.113**
螞蟥菊内酯-12	10	0.798±0.070*	0.194±0.115***

“***”表示 $p < 0.001$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有极为显著性差异。

“**”表示 $p < 0.01$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有非常显著性差异。

“*”表示 $p < 0.05$ 与阴性对照组(0.5% CMC)相比有显著性差异。

15

实施例6

片剂的制备

利用常规技术,混合以下组分,然后直接压片,制备片剂形式的药物组合物,其配方如下:

成分	每片含量
实施例1制备螞蟥菊内酯	20mg
乳糖	130mg
玉米淀粉	40mg
硬脂酸镁	10mg
总量	200mg

实施例7

片剂的制备

利用常规技术，混合以下组分，然后直接压片，制备片剂形式的药物组

5 合物，其配方如下：

成分	每片含量
实施例1制备螞蟥菊内酯	15mg
布洛芬	5mg
乳糖	130mg
玉米淀粉	40mg
硬脂酸镁	10mg
总量	200mg

实施例8

片剂的制备

利用常规技术，混合以下组分，然后直接压片，制备片剂形式的药物组

10 合物，其配方如下：

成分	每片含量
实施例1制备螞蟥菊内酯	15mg
氢化可的松	5mg
乳糖	130mg
玉米淀粉	40mg
硬脂酸镁	10mg
总量	200mg

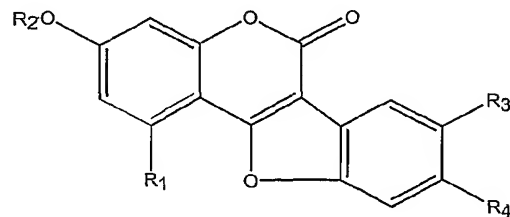
在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样

15 落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种式 I 的香豆草醚类化合物或其药学上可接受的盐, 或者含式 I 的香豆草醚类化合物或其药学上可接受的盐的提取物的用途,

5



I

式中,

R₁ 代表氢原子、羟基、甲氧基;

R₂ 代表氢原子、羟基、C₁-C₈ 烷基;

R₃ 和 R₄ 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基;

10

其特征在于, 被用于制备治疗或预防关节炎病的药物。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述的药学上可接受的盐是式 I 化合物与选自下组的酸所形成的盐: 氢氯酸、氢溴酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、或羟乙磺酸。

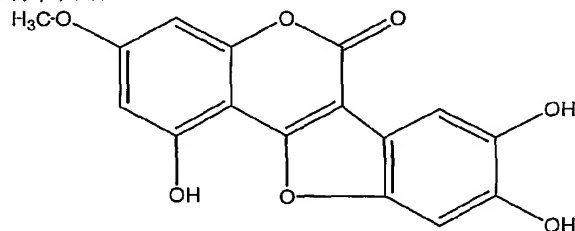
15

3. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述的式 I 化合物或所述的提取物是从菊科植物中提取的。

4. 如权利要求 3 所述的用途, 其特征在于, 所述的菊科植物选自鳢肠 (*Eclipta prostrata* Linn)、蟛蜞菊 (*Wedelia chinensis*) 或旱莲草 (*Eclipta alba*)。

20

5. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述的式 I 化合物是具有式 II 的蟛蜞菊内酯:



II

6. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述的关节炎病选自下组: 风湿性或类风湿性关节炎、骨关节炎。

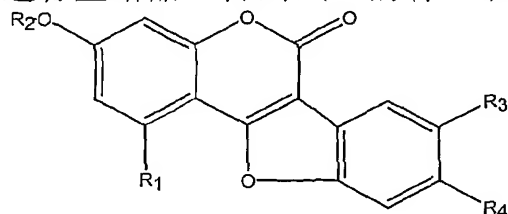
7. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述式 I 化合物是通过包括以下步骤的提取方法获得的:

25

- (a) 用 $95 \pm 3\%$ 乙醇提取菊科植物的果实、叶或枝，得到乙醇浸膏；
 (b) 取乙醇浸膏，用 5-300 倍于浸膏体积的 $50-80^\circ\text{C}$ 的水溶解，过滤去除杂质，回收水相；
 (c) 用乙酸乙酯萃取步骤(b)的水相，回收乙酸乙酯相；
 5 (d) 对步骤(c)的乙酸乙酯相进行干燥，得到沉淀物；
 (e) 在硅胶柱上，用梯度为 5:1 至 1:2 的石油醚/丙酮洗脱剂进行洗脱步骤(c)的沉淀物，收集石油醚：丙酮为 1:1 的洗脱组分；
 (f) 对步骤(e)的洗脱组分进行浓缩，得浓缩物；
 (g) 在硅胶柱上，用梯度为 5:1 至 1:2 的二氯甲烷/丙酮洗脱剂洗脱步骤
 10 (f)的浓缩物，收集二氯甲烷：丙酮为 3:1 的洗脱组分；
 (h) 在硅胶柱上，用梯度为 20:10:1 至 5:10:1 的甲苯-丙酮-甲酸洗脱剂洗脱步骤(g)的洗脱组分，收集甲苯：丙酮：甲酸为 10:10:1 的洗脱组分；
 (i) 在硅胶柱上，用梯度为 30:1 至 1:1 的二氯甲烷/甲醇洗脱剂洗脱步骤(h)的洗脱组分，收集二氯甲烷：甲醇为 20:1 的洗脱组分；
 15 (j) 用乙醇进行重结晶，得到式 I 的香豆草醚类化合物沉淀。

8. 一种制备香豆草醚类化合物的方法，其特征在于，包括以下步骤：

- (a) 用 $95 \pm 3\%$ 乙醇提取菊科植物的果实、叶或枝，得到乙醇浸膏；
 (b) 取乙醇浸膏，用 5-300 倍于浸膏体积的 $50-80^\circ\text{C}$ 的水溶解，过滤去除杂质，回收水相；
 20 (c) 用乙酸乙酯萃取步骤(b)的水相，回收乙酸乙酯相；
 (d) 对步骤(c)的乙酸乙酯相进行干燥，得到沉淀物；
 (e) 在硅胶柱上，用梯度为 5:1 至 1:2 的石油醚/丙酮洗脱剂进行洗脱步骤(c)的沉淀物，收集石油醚：丙酮为 1:1 的洗脱组分；
 (f) 对步骤(e)的洗脱组分进行浓缩，得浓缩物；
 25 (g) 在硅胶柱上，用梯度为 5:1 至 1:2 的二氯甲烷/丙酮洗脱剂洗脱步骤(f)的浓缩物，收集二氯甲烷：丙酮为 3:1 的洗脱组分；
 (h) 在硅胶柱上，用梯度为 20:10:1 至 5:10:1 的甲苯-丙酮-甲酸洗脱剂洗脱步骤(g)的洗脱组分，收集甲苯：丙酮：甲酸为 10:10:1 的洗脱组分；
 (i) 在硅胶柱上，用梯度为 30:1 至 1:1 的二氯甲烷/甲醇洗脱剂洗脱步骤
 30 (h)的洗脱组分，收集二氯甲烷：甲醇为 20:1 的洗脱组分；
 (j) 用乙醇进行重结晶，得到式 I 的香豆草醚类化合物沉淀



I

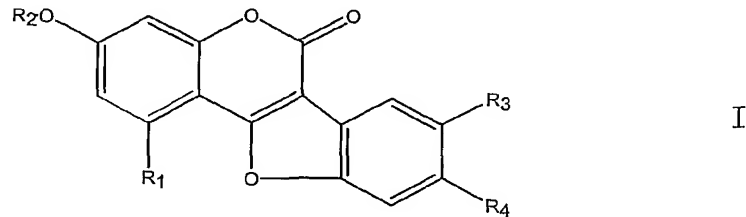
式中，

R_1 代表氢原子、羟基、甲氧基；

R_2 代表氢原子、羟基、 C_1-C_8 烷基；

R_3 和 R_4 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基。

- 5 9. 一种保健品，其特征在于，它含有 0.05-50wt% 的式 I 化合物或其药学上可接受的盐



式中，

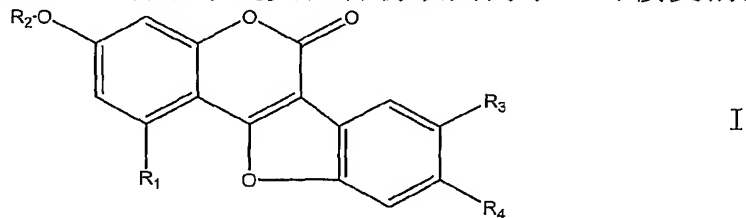
R_1 代表氢原子、羟基、甲氧基；

R_2 代表氢原子、羟基、 C_1-C_8 烷基；

- 10 R_3 和 R_4 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基；
和食品上可接受的载体。

10. 一种治疗关节炎的药物组合物，其特征在于，它含有

(a) 含有作为主要活性成分的 0.05-90wt% 的式 I 化合物或其药学上可接受的盐，或者含式 I 的香豆草醚类化合物或其药学上可接受的盐的提取物



- 15 式中，

R_1 代表氢原子、羟基、甲氧基；

R_2 代表氢原子、羟基、 C_1-C_8 烷基；

R_3 和 R_4 各自独立地选自氢原子、卤素原子、羟基、甲氧基；

- 20 (b) 选自下组的一种或多种辅助活性成分：阿西美辛、双氯芬酸钠、布洛芬、吲哚美辛、美洛昔康、酮洛芬、舒林酸、金诺芳、萘普生、萘丁美酮、吡罗昔康、甲氯灭酸、氯灭酸、甲灭酸、吡洛芬、芬布芬、托美汀、氟灭酸、非诺芬、舒筋灵，尼美舒利、赛利克西、罗非克西、醋氯芬酸；甲氨蝶呤、金制剂、柳氮磺吡啶、青霉胺、氯喹、雷公藤、环孢素、环磷酰胺；或糖皮质激素；和

- 25 (c) 药学上可接受的载体。

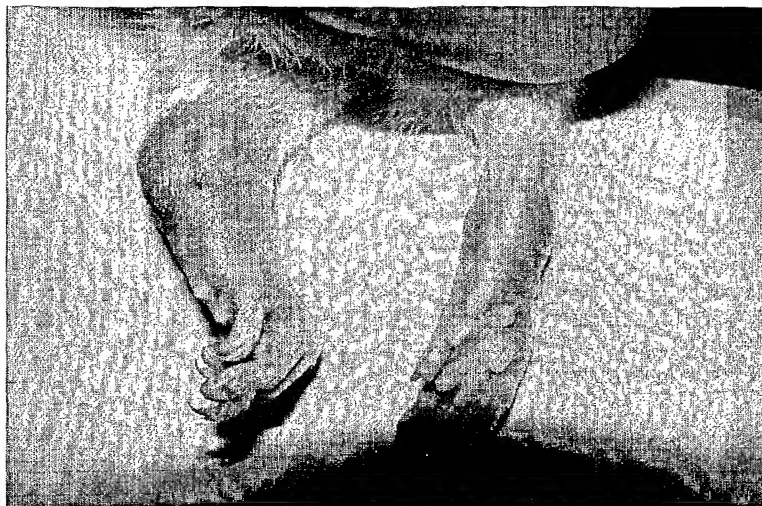


图 1

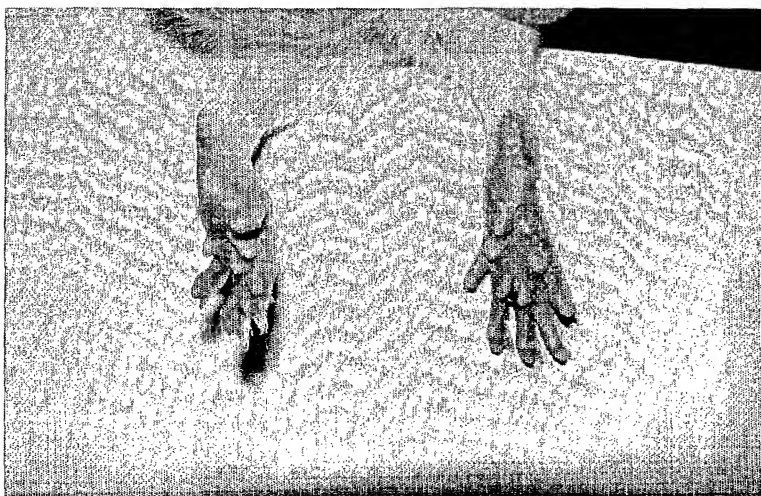


图 2

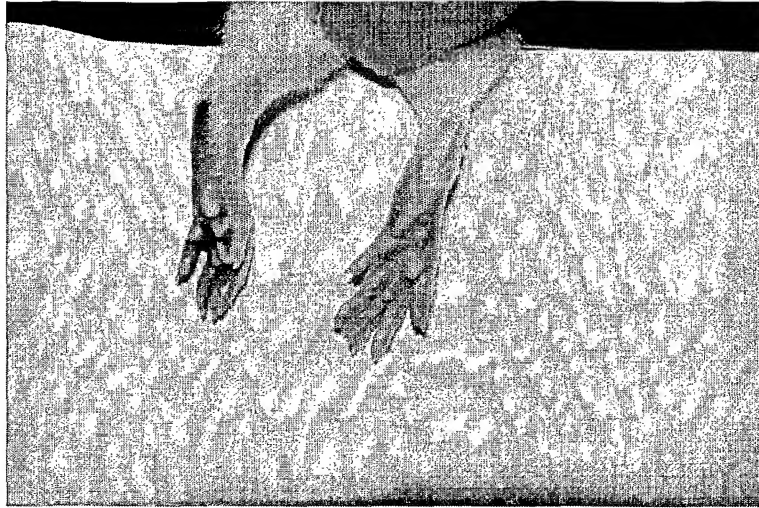


图 3

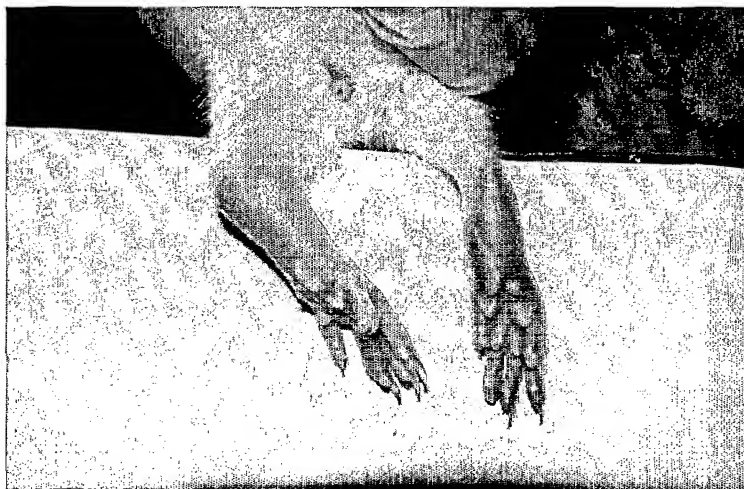


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2004/001523

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: A61K31/366, A61K35/78, A61P19/02, A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNKI

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, MEDLINE, CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A2,0141709 (HARVARD COLLEGE) 14.Jun.2001(14.06.2001), see the whole document	1-7
A	Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1997,28(7): 421-422, KUANG Lixia et.al., "Experimental study on anti-inflammatory and analgesic action of Wedelia chinensis Merr."	1-7
A	Journal of China Pharmaceutical University, 1995,26(4):226-229, HU Huijuan et.al. "Study on anti-inflammatory action and mechanism of Herba Eclipta prostrata L."	1-7
	-/--	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25.Apr.2005 (25.04.2005)

Date of mailing of the international search report
11 . MAY 2005 (11 . 05 . 2005)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
SHENG Qian
Telephone No. (86-10) 62085235



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/001523

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

claims 1-7,
claim 8;
claims 9-10.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-7.

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2004/001523

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO, A2, 0141709	14.06.2001	JP, T, 2003516328	13.05.2003
		US, A1, 2002049251	25.04.2002
		EP, A2, 1237550	11.09.2002
		US, B2, 6552071	22.04.2003

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/001523

A. 主题的分类

IPC7: A61K31/366, A61K35/78, A61P19/02, A61P29/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国期刊网全文数据库

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, PAJ, MEDLINE, CA

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO,A2,0141709 (HARVARD COLLEGE) 2001 年 6 月 14 日(14.06.2001), 全文	1-7
A	中草药, 1997,28(7):421-422, 邝丽霞等, "蟛蜞菊抗炎镇痛作用的实验研究"	1-7
A	中国药科大学学报, 1995,26(4): 226-229, 胡慧娟等, "旱莲草的抗炎作用及机制研究"	1-7
	-/--	

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

25.4 月 2005 (25.04.2005)

国际检索报告邮寄日期

11 · 5 月 2005 (11 · 05 · 2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

盛情



电话号码: (86-10) 62085235

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/001523

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题,即:

2. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分,以致不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求,并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明,即:

权利要求1-7;

权利要求8;

权利要求9-10。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费,本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索,本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费,本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说,是权利要求:

4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此,本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明;
包含该发明的权利要求是:
权利要求1-7

关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费,同时提交了异议书,缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费,同时提交了异议书,但未缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/001523

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO, A2, 0141709	14.06.2001	JP, T, 2003516328	13.05.2003
		US, A1, 2002049251	25.04.2002
		EP, A2, 1237550	11.09.2002
		US, B2, 6552071	22.04.2003